

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 31420091150077

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于两亲性嵌段聚合物载羟基喜树碱的自
组装粒子及其性能研究

Preparation and evaluation of self-assembled
hydroxycamptothecin-loading particles using amphiphilic
diblock copolymer

常 迪

指导教师姓名: 张其清 教 授

侯振清 副教授

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2012 年 月

论文答辩日期: 2012 年 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

基于两亲性嵌段聚合物载羟基喜树碱的自组装粒子及其性能研究	2.5cm
常迪	
指导教师 张其清教授	
博导 侯振清副教授	2.5cm

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

摘要

近年来,两亲性嵌段聚合物自组装制备载药粒子备受关注。这种方法工艺简单并且可以减少甚至避免使用表面活性剂,易于工业化生产。羟基喜树碱(HCPT)是一种吲哚类生物碱,它通过抑制拓扑异构酶 I 而抑制肿瘤细胞的增殖,为广谱抗肿瘤药物。目前,临床上使用的 HCPT 主要剂型为注射用水针剂,这种开环的羧酸盐因其临床疗效低、半衰期短等缺点限制了该制剂的应用。

本文以 MePEG-PLGA 为药物载体,以闭环 HCPT 为模型药物,采用改良的透析法自组装载羟基喜树碱的纳米粒,并考察其制备优化条件、体外释放性能及细胞毒性。采用 SPG 模板法可控自组装了载羟基喜树碱的“彗星”状 MePEG-PLGA-HCPT 粒子,考察其形成机理、体外释放性能及细胞毒性。研究结果如下:(1)采用改良的透析法成功自组装了 MePEG-PLGA-HCPT 纳米粒。以粒径和载药率为评价标准。进行制备条件优化实验。优化后的最佳条件为采用丙酮作为溶剂,透析袋截留分子量(MWCO)为 14000 D,透析温度为 25 ℃,透析初始含水量 1%,透析外水相 pH=4.0,聚合物浓度为 3 mg/mL,载体中的 PEG 含量 15%,载体中的 LA 含量为 100%,HCPT 与 MePEG-PLGA 投料质量比 1:5。根据优化实验结果,对优化条件下制备的 MePEG-PLGA-HCPT 纳米粒的粒径、Zeta 电位、载药量、包封率、形态、HCPT 的存在状态及分布进行鉴定。结果表明:MePEG-PLGA-HCPT 纳米粒为实心球形壳核结构,表面圆滑,粒径分布均一,分散性好,平均粒径为 120.1 nm、多分散系数为 0.057、Zeta 电位为-31.2 mV。MePEG-PLGA-HCPT 纳米粒的载药量为 7.417%,包封率为 44.5%,且 HCPT 以晶体形状态均匀分布于纳米粒中。优化条件下制备的 MePEG-PLGA-HCPT 纳米粒在三种 pH 条件下的体外释放分为突释和缓释两部分,且随着释放介质 pH 值的上升,纳米粒释放速率加快。(2)MTT 试验表明:纳米粒组和 HCPT 纯药物组对肝癌细胞均有一定程度的杀伤作用且其抑制率呈现明显药物浓度依赖性,其中载药纳米粒组具有较强的抑瘤作用且抑瘤效果优于纯药组。此外,激光共聚焦荧光显微镜技术证明了载药纳米粒能有效的被 Bel-7402 细胞摄取,且摄取量与载药纳米粒的浓度有关。(3)采用两亲性嵌段聚合物 MePEG-PLGA 为载体结合 SPG

模板法成功制备了自组装“彗星”状载药粒子。载药粒子在电镜下呈“彗星”状，其中头部螺旋成束，尾部为散开的纳米束。头部直径大小与 SPG 膜孔径相当，尾部纳米束散开幅度与制备时氮气压力大小成反比。确定了载药粒子的最佳工艺：即 HCPT 与 MePEG-PLGA 的质量比为 1:1，氮气压力为 100 kPa，SPG 膜孔径为 1.1 μm ；本研究制备的载药粒子的载药量可达到 48.3 %，包封率可以达到 96.6 %，Zeta 电位 -31.4 mV。药物以无定形态均匀分布于 MePEG-PLGA 粒子中。对于“彗星”状载药粒子的形成机理提出了蠕虫模式组装体假说。体外释药试验表明“彗星”状 MePEG-PLGA-HCPT 载药粒子具有药物缓释的优点，且药物释放的速度随着载药率的增加而增大。这种形貌的载药粒子相对于球形载药粒子有可能对肝癌细胞 Bel-7402 的生长和增殖抑制作用更强。

关键词：两亲性嵌段聚合物 羟基喜树碱 纳米粒子 彗星状 自组装

Abstract

Developments in preparation of drug-loading particles by self-assembly method using amphiphilic block copolymer are concerned in recent years. It is an acceptably simple and effective method for preparation particles using only a little surfactant or without the additional surfactants, which is expected to apply in industrial production. 10-hydroxycamptothecin (HCPT) is a promising broad-spectrum antitumor agent that targets the nuclear enzyme topoisomerase I and has achieved remarkable success in early clinical trials. However, the clinical application of HCPT was largely hampered because of its poor solubility and stability, which led to low therapeutic efficiency and a number of side effects to normal tissues such as neutropenia, thrombocytopenia, and diarrhea owing to the conversion of HCPT from active lactone form to the inactive carboxylate form under physiologic conditions. Therefore, finding suitable formulations for the delivery of the HCPT is of great significance in fully unleashing the potential of HCPT drug. The contents are summarized as follows:

(1) Preparation and characterization of HCPT-loaded MePEG-PLGA nanoparticles: in this work, our aim was to obtain the nanoparticles of desired size range (about 200 nm) and highest drug-loading content. For this purpose, influences of different initial organic solvents, different MWCO of dialysis bag, different temperature, different initial water content, different pH of external phase, different initial copolymer concentration, different PEG content of copolymer, different LA content of copolymer, and different ratio of HCPT to MePEG-PLGA were investigated to obtain the optimal formulation condition. The analysis results of univariate analysis performed by statistical software SPSS 13.0 are presented as follow: initial organic solvents: acetone; MWCO of dialysis bag: 14000 D; temperature: 25 °C; initial water content: 1 %; pH of external phase: 4.0; initial copolymer concentration: 3 mg/ml; PEG content of copolymer: 15 %; LA content of copolymer: 100 %; the ratio of HCPT to MePEG-PLGA: 1:5. The obtained MePEG-PLGA-HCPT nanoparticles were characterized by dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM)/transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC) and confocal laser scanning fluorescence microscope (CLSM). Based on these experimental results, it was proposed that MePEG-PLGA-HCPT-NPs exhibited a

solid spherical shape, fairly uniform size, well dispersed, and relatively smooth surface with core-shell structure. The distribution of HCPT in MePEG-PLGA nanoparticles was very uniform. and HCPT was a crystalline state existed in MePEG-PLGA-NPs. The drug-loading and entrapment efficiency respectively of nanoparticles were 7.417 % and 44.5 %. Their release behavior in vitro showed biphasic characteristics of burst releasing and sustained releasing.

(2) In vitro cytotoxicity assay of HCPT-loaded MePEG-PLGA nanoparticles:

Cytotoxicity test indicated that the HCPT-loaded MePEG-PLGA nanoparticles had enhanced in vitro cytotoxicity against human liver BEL-7402 cells compared to the commercially available HCPT injection and it was obvious that the growth-inhibitory effect was concentration dependent. MePEG-PLGA-HCPT nanoparticles enhance the intracellular uptake of HCPT in BEL-7402 cells.

(3) Preparation, characterization and in vitro assay of comet-like MePEG-PLGA-HCPT particles: we prepared comet-like MePEG-PLGA-HCPT particles by SPG membrane template self-assembly technique and discuss the influence of fabrication procedures on the formaton of comet-like particles. These particles exhibited a comet-like shape, fairly uniform size and well dispersed. The sample consisted of a large quantity of comet-like structures with a length of 10-15 μm and comet's head width of 400nm- 1.5 μm with helical structure. The comet's tail consist of nanofibrous (80–200 nm in width) radiating out from the comet's head, displaying a bundle of nanofibrous. The particle sizes (119.3 nm at average) are coincide with the SEM images for the nanofibrous. The extent of the comet's tail depends on the nitrogen pressure, and the diameter of the comet-like particles head depends on the membrane pore size. To obtain highest entrapment efficiency and highest drug-loading content, an orthogonal L9 (3^3) test design was used to investigate the optimal formulation condition. We can conclude that the optimized formulation should be A2B2C3 (ratio of HCPT to MePEG-PLGA = 1:1; nitrogen pressure = 100 KPa; SPG membrane pore size = 1.1 μm). Based on the above optimum conditions, the drug-loading content was up to as high as 48.3 %, with entrapment efficiency of 96.6 %, and zeta -31.4 mV. The distribution of HCPT in comet-like particles was very uniform. and HCPT was a amorphous state existed in particles. A possible mechanism for formation of the comet-like particles can be proposed, that the worm-like mode assembly. The study of in vitro release of HCPT from comet-like particles exhibited a

slow, prolonged release profile over a period of 120 h. In contrast to a significant burst release at the initial stage that appeared in particles with DLC of 46.2% or 21.7%, the release profiles exhibited a very steady sustained release pattern with negligible initial burst release in particles with DLC of 11.4%. Cytotoxicity test indicated that the HCPT-loaded comet-like particles had enhanced in vitro cytotoxicity against human liver BEL-7402 cells compared to the commercially available HCPT injection and HCPT-loaded spherical particles and it was obvious that the growth-inhibitory effect was concentration dependent.

Key words: amphiphilic block copolymer; hydroxycamptothecin(HCPT); nanoparticles; comet-like; self-assembled

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
第一章 绪 论	1
1.1 药物控缓释释放系统.....	1
1.2 微粒载药控释系统.....	3
1.3 用作微粒缓释制剂药物载体的可降解高分子材料.....	6
1.4 长循环载药微粒制剂的研究进展.....	9
1.5 微粒形貌的研究进展.....	10
1.6 羟基喜树碱的理化性质和药理学性质及剂型研究进展.....	16
1.7 本课题的研究目的和意义及主要内容.....	19
参考文献.....	21
第二章 载羟基喜树碱 MePEG-PLGA 纳米粒的制备及表征.....	26
2.1 引言.....	26
2.2 实验部分.....	27
2.3 结果与讨论.....	33
2.4 结论.....	52
参考文献.....	54
第三章 载羟基喜树碱 MePEG-PLGA 纳米粒对肝癌细胞生物效应的 评价.....	57
3.1 引言.....	57
3.2 仪器与材料.....	57
3.3 实验方法.....	59
3.4 结果与讨论.....	61
3.5 结论.....	64
参考文献.....	65
第四章 “彗星”状 MePEG-PLGA-HCPT 粒子的制备与表征及体外评 价研究.....	67
4.1 引言.....	67

4.2 实验部分	68
4.3 结果与讨论	77
4.4 结 论	88
参考文献	89
全文总结与展望	91
硕士期间科研成果及所获奖励	94
致 谢	96

Contents

摘 要	I
Abstract.....	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Drug Controlled and Sustained Release System	1
1.2 Particulate drug delivery controlled release system	3
1.3 Biodegradable polymer materials using as a drug carrier particles for sustained-release	6
1.4 Progress in long-circulating drug carrier particles.....	9
1.5 Progress in particle morphology	10
1.6 The physicochemical and pharmacological properties of HCPT	16
1.7 Objective and content of this dissertation.....	19
References	21
Chapter 2 Preparation and characterization of HCPT loading MePEG-PLGA nanoparticles	26
2.1 Introduction	26
2.2 Experiments	27
2.3 Results and disscussion	33
2.4 Summary	52
References	54
Chapter 3 Evaluation of bioeffect on hepatocellular carcinoma cells of HCPT loaded MePEG-PLGA nanoparticles	57
3.1 Introduction	57
3.2 Instruments and materials.....	57
3.3 Experiments	59

3.4 Results and discussion.....	61
3.5 Summary	64
References	65
Chapter 4 Preparation, characterization and in vitro evaluation of comet-like MePEG-PLGA- HCPT particles	67
4.1 Introduction	67
4.2 Experiments	68
4.3 Results and discussion	77
4.4 Summary	88
References	89
Conclusions and Future Works.....	91
Publications	94
Acknowledgements	96

第一章 绪论

1.1 药物控缓释释放系统

药物控缓释释放系统(Drug Controlled and Sustained Release System) (DCRS) 是药物传递系统(Drug Delivery System)中的一种特殊系统, 它可以使药物以某一预期的速率缓慢释放, 从而达到调控动物体内药物浓度的目的^[1,2]。药物控缓释释放系统克服了传统的给药方式很多弊端, 可以较长的时间的维持体内药物浓度, 使血液或人体内组织中药物浓度保持稳定。药物控制释放系统是现代药剂学发展的一个崭新领域, 能使血液或病灶组织中的药物浓度长时间内保持在有效治疗指数范围内(图 1.1), 具有安全、有效、使用方便等特点。相对于传统的给药方式, 药物控制释放系统可以提高药效, 降低药物毒副作用, 减轻病人服药痛苦等。如今, 药物控缓释释放系统已经成为给药技术的研究热点, 引起了人们的极大关注, 其理论和应用研究都取得了可喜的进展。

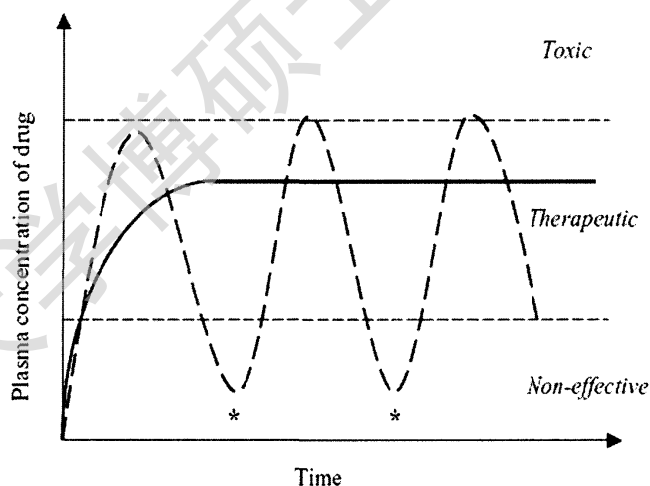


图 1.1 服用缓释制剂和传统药物制剂后的血药浓度变化

Fig. 1.1 Drug concentration changes in blood after taking drug delivery system and the traditional doses

1.1.1 药物控缓释释放系统的发展阶段

药物释放系统的发展经历了五个阶段^[3]: 第一个阶段是简单加工而成的供口服或外用的膏、丹、丸、散等剂型; 第二个阶段是注射剂、胶囊剂、片剂和气雾

剂等剂型；第三个阶段是控释、缓释剂型，无需要频繁给药，能维持体内药物的有效浓度；第四个阶段是靶向给药系统，能使药物富集于靶器官、靶组织、靶细胞等，提高疗效并降低全身毒副作用；第五个阶段是智能给药系统，它们能根据所接收的反馈信息自动调节释放药量，是一种自调式给药方式。为使药物制剂具有以上所述的功能，作为药物载体的医用材料及载体的形式等起着关键作用。它们不仅仅起赋形剂的作用，同时还必须起到对药物缓释、靶向、延长药物活性及用药简便的作用。

1.1.2 药物控缓释释放系统的功能

科学家们对药物的控缓释进行了大量的研究，并总结出药物控释体系所具备的以下主要功能：(1)药物控制释放功能：使目标给药部位的血药浓度维持在标准范围内；(2)药物靶向释放功能：使药物输送到特定的目标治疗部位。我们理想的药物控释体系还应满足如下要求^[4,5]：(1)药物应直接输送到病患部位；(2)在达到目标疗效的前提下，尽量减少药物的投放量；(3)尽量使药物的毒副作用最小，且用药安全、可靠；(4)使用方便，易于被患者接受；(5)在通常环境下具有一定的物理和化学稳定性。

表 1.1 不同粒径的药物载体体内靶向的部位^[4]

Table 1.1 The function of carriers size and the target location in the body^[4]

载体粒径	体内靶向
<50 nm	穿过肝脏或通过淋巴传输到脾和骨髓，也可到达肿瘤组织最终进入肝脏
0.1 μ m-0.2 μ m	被网状内皮系统吸收，最后富集于肝、脾中
1 μ m	白细胞吞噬
2 μ m-12 μ m	毛细血管摄取，不仅可到达肺，也可进入肝、脾
7 μ m-12 μ m	在肺中富集
>12 μ m	阻滞在毛细血管末端

1.2 微粒载药控释系统

目前,已经有很多种微粒载药控释系统被 FDA 批准或者已用于临床当中。大量研究表明:不仅材料的性能影响载体的控释性能,载体形式的差异、尺寸的大小也很大程度上影响药物的传输与释放行为。表 1.1 显示,载体尺寸的不同,体内最终富集的组织或器官也相异^[4]。按照载体的结构与载药方式,缓释制剂的载体主要有以下几种形式:高分子前体药物、微(纳)球、微胶囊、水凝胶和胶束。

1.2.1 微粒缓释药物制剂的制备方法

1.2.1.1 界面聚合法

将两种带不同活性基团的单体分别溶于两种互不相容的溶剂中,当一种溶液分散到另一种溶液中时,在两种溶液的界面上形成了一层聚合物膜,这就是界面聚合的基本原理。常用的活性单体有多元醇、多元胺、多元酚和多元酰氯、多异氰酸酯等。其中,多元醇、多元胺和多元酚可溶于水相,多元酰氯和多异氰酸酯则可溶于有机溶剂(油)相,反应后分别形成聚酰胺、聚酯、聚脲或聚氨酯。

如果被包裹物是亲油性的,应将被包裹物和油溶性单体先溶于有机溶剂,然后将此溶液在水中分散成很细的液滴。再在不断搅拌下往水相中加入含有水溶性单体的水溶液,于是在液滴表面上很快生成一层很薄的聚合物膜。经沉淀、过滤和干燥后,便得到包有液滴的微胶囊。如果被包裹的是水溶性物,则整个过程正好与上述方法相反。界面聚合法制备微胶囊要求被包裹物能耐酸碱性和不能与单体发生反应。此外,包入微胶囊中的微量多余单体的去除也是必须认真对待的技术问题。界面聚合法所得微胶囊的壁很薄,为 $0.001\sim 0.011\ \mu\text{m}$,被包裹物渗透性较好。颗粒粒径 $0.001\sim 1\ \text{mm}$,可通过搅拌速度来调节。搅拌速度高,颗粒直径小而且分布窄。加入适量表面活性剂也可达到同样目的。

1.2.1.2 水(油)中相分离法

将聚合物溶于适当介质(水或有机溶剂),并将被包裹物分散于该介质中,然后向介质中逐步加入聚合物的非溶剂,使聚合物从介质中凝聚出来,沉积在被包裹物颗粒表面而形成微胶囊。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库